

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

22 July 1998 (22.07.98)

International application No.

PCT/NL97/00624

Applicant's or agent's file reference

WO 800041-A1

International filing date (day/month/year)

14 November 1997 (14.11.97)

Priority date (day/month/year)

15 November 1996 (15.11.96)

Applicant

VAN VENROOIJ, Waltherus, Jacobus, Wilhelmus et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

12 June 1998 (12.06.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

S. Cruz

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference WO 800041-A1	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/NL 97/ 00624	International filing date (day/month/year) 14/11/1997	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 15/11/1996
Applicant STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK NEDERLAND et al.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box I).

2. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

3. ☐ The international application contains disclosure of a **nucleotide and/or amino acid sequence listing** and the international search was carried out on the basis of the sequence listing

☐ filed with the international application.

☐ furnished by the applicant separately from the international application.

☐ but not accompanied by a statement to the effect that it did not include matter going beyond the disclosure in the international application as filed.

☐ Transcribed by this Authority

4. With regard to the **title**, ☒ the text is approved as submitted by the applicant

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☐ the text is approved as submitted by the applicant

☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International Search Report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is:

Figure No. _____ ☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NL 97/ 00624

Box III TEXT OF THE ABSTRACT (Continuation of item 5 of the first sheet)

THE INVENTION RELATES TO A PEPTIDE DERIVED FROM AN ANTIGEN RECOGNIZED BY AUTOANTIBODIES, WHICH PEPTIDE IS REACTIVE WITH AUTOIMMUNE ANTIBODIES FROM A PATIENT SUFFERING FROM RHEUMATOID ARTHRITIS. THE PEPTIDE ACCORDING TO THE INVENTION POSSESSES A MODIFIED ARGININE RESIDUE. THE INVENTION ALSO RELATES TO ANTIBODIES AGAINST THE PEPTIDE AND A METHOD OF DETECTING AUTOIMMUNE ANTIBODIES.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No
PCT/NL 97/00624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/68 G01N33/564 //C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R. HOET ET AL.: "Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin." ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 50, no. 9, September 1991, LONDON, GB, pages 611-618, XP002038024 see page 612, left-hand column, line 14 - line 52 --- -/--	10-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 June 1998

Date of mailing of the international search report

30/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. SEBBAG ET AL.: "The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, no. 6, June 1995, NEW YORK, NY, VS, pages 2672-2679, XP002038025 see the whole document ---	10-13
X	M. SIMON ET AL.: "The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies", autoantibodies specific for rheumatoid arthritis." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 92, no. 3, September 1993, NEW YORK, NY, VS, pages 1387-1393, XP002038026 see page 1388, left-hand column, line 21 - line 26 ---	10-13
A	EP 0 511 116 A (CLONATEC S.A.) 28 October 1992 cited in the application see the whole document ---	1-15
A	S-Q. GAN ET AL.: "Organization, structure and polymorphisms of the human profilaggrin gene." BIOCHEMISTRY, vol. 29, no. 40, 9 October 1990, VS, pages 9432-9440, XP002038027 cited in the application see figures 1,2 see abstract ---	1-9
A	Y. MISAKI ET AL.: "The 56K autoantigen is identical to human annexin XI." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 6, 11 February 1994, BALTIMORE, MD, VS, pages 4240-4246, XP002038028 see the whole document ---	1-9
P, O, X	G. SCHELLEKENS ET AL.: "The modified arginine residue citrulline is the major constituent of epitopes recognized by autoantibodies in sera from rheumatoid arthritis patients." ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 40, no. 9 suppl., 8 - 12 November 1997, NEW YORK, NY, USA, page S276 XP002067877 see abstract 1471 ---	1-15

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No
PCT/NL 97/00624

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	FR 2 752 842 A (BIOMÉRIEUX ET AL.) 6 March 1998 see the whole document -----	1, 3, 7-11, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 97/00624

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 511116	A	28-10-1992	FR 2675805 A	30-10-1992
			FR 2681600 A	26-03-1993
			CA 2084876 A	27-10-1992
			WO 9219649 A	12-11-1992
			JP 6502187 T	10-03-1994
<hr/>				
FR 2752842	A	06-03-1998	WO 9808946 A	05-03-1998
<hr/>				

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference WO 800041-A1	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/NL 97/ 00624	International filing date (day/month/year) 14/11/1997	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 15/11/1996
Applicant STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK NEDERLAND et al.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box I).

2. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

3. ☐ The international application contains disclosure of a nucleotide and/or amino acid sequence listing and the international search was carried out on the basis of the sequence listing

☐

filed with the international application.

☐

furnished by the applicant separately from the international application.

☐

but not accompanied by a statement to the effect that it did not include matter going beyond the disclosure in the international application as filed.

☐

Transcribed by this Authority

4. With regard to the title, ☒ the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☐

the text is approved as submitted by the applicant

☒

the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International Search Report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is:

Figure No. _____

☐

as suggested by the applicant.

☐

because the applicant failed to suggest a figure.

☐

because this figure better characterizes the invention.

☒

None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NL 97/00624

Box III TEXT OF THE ABSTRACT (Continuation of item 5 of the first sheet)

THE INVENTION RELATES TO A PEPTIDE DERIVED FROM AN ANTIGEN RECOGNIZED BY AUTOANTIBODIES, WHICH PEPTIDE IS REACTIVE WITH AUTOIMMUNE ANTIBODIES FROM A PATIENT SUFFERING FROM RHEUMATOID ARTHRITIS. THE PEPTIDE ACCORDING TO THE INVENTION POSSESSES A MODIFIED ARGININE RESIDUE. THE INVENTION ALSO RELATES TO ANTIBODIES AGAINST THE PEPTIDE AND A METHOD OF DETECTING AUTOIMMUNE ANTIBODIES.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 97/00624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/68 G01N33/564 //C12P21/00

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R. HOET ET AL.: "Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin." ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 50, no. 9, September 1991, LONDEN, GB, pages 611-618, XP002038024 see page 612, left-hand column, line 14 - line 52 --- -/--	10-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 June 1998

Date of mailing of the international search report

30/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 97/00624

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. SEBBAG ET AL.: "The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, no. 6, June 1995, NEW YORK, NY, VS, pages 2672-2679, XP002038025 see the whole document ---	10-13
X	M. SIMON ET AL.: "The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies", autoantibodies specific for rheumatoid arthritis." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 92, no. 3, September 1993, NEW YORK, NY, VS, pages 1387-1393, XP002038026 see page 1388, left-hand column, line 21 - line 26 ---	10-13
A	EP 0 511 116 A (CLONATEC S.A.) 28 October 1992 cited in the application see the whole document ---	1-15
A	S-Q. GAN ET AL.: "Organization, structure and polymorphisms of the human profilaggrin gene." BIOCHEMISTRY, vol. 29, no. 40, 9 October 1990, VS, pages 9432-9440, XP002038027 cited in the application see figures 1,2 see abstract ---	1-9
A	Y. MISAKI ET AL.: "The 56K autoantigen is identical to human annexin XI." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 6, 11 February 1994, BALTIMORE, MD, VS, pages 4240-4246, XP002038028 see the whole document ---	1-9
P,O, X	G. SCHELLEKENS ET AL.: "The modified arginine residue citrulline is the major constituent of epitopes recognized by autoantibodies in sera from rheumatoid arthritis patients." ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 40, no. 9 suppl., 8 - 12 November 1997, NEW YORK, NY, USA, page S276 XP002067877 see abstract 1471 ---	1-15

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 97/00624

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ¹	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	FR 2 752 842 A (BIOMÉRIEUX ET AL.) 6 March 1998 see the whole document -----	1,3, 7-11,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 97/00624

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 511116	A	28-10-1992	FR 2675805 A	30-10-1992
			FR 2681600 A	26-03-1993
			CA 2084876 A	27-10-1992
			WO 9219649 A	12-11-1992
			JP 6502187 T	10-03-1994
<hr/>				
FR 2752842	A	06-03-1998	WO 9808946 A	05-03-1998
<hr/>				

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

REC'D	0 4 MAR 1999
WIPO	PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference WO 800041-A1	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/NL97/00624	International filing date (day/month/year) 14/11/1997	Priority date (day/month/year) 15/11/1996
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K14/47		
Applicant STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK NEDERLAND et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.


2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12/06/1998	Date of completion of this report
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer Huber, A Telephone No. (+49-89) 2399 8173



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL97/00624

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

Description, pages:

1-12 as originally filed

Claims, No.:

1-15 as originally filed

Drawings, sheets:

1/1 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL97/00624

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	4-6, 9, 13, 14
	No:	Claims	1-3, 7, 8, 10-12, 15
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	4-6, 9, 13, 14
	No:	Claims	1-3, 7, 8, 10-12, 15
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-15
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

SECTION V -----

1. The present application relates to a peptide derived from an antigen recognized by autoantibodies from patients with rheumatoid arthritis, characterized in that an arginine residue of the peptide has been modified.

2. Reference is made to the following documents:

D1: Simon et al., J. Clin. Invest., Vol. 92, pp. 1387-1393, 1993

D2: Hoet et al., Annals of the Rheumatic Diseases, Vol. 50, pp. 611-618, 1991

3. Novelty and inventive step (Art. 33(2) and (3) PCT):

D1 discloses a 40kD protein which is immunoreactive with autoantibodies from patients with rheumatoid arthritis (RA). The protein was shown to be a modified form of filaggrin, containing citrulline residues which result from conversion of arginine.

The peptide of Claim 1, which is reactive with autoimmune antibodies, is characterized as corresponding to a part of a mRNA molecule coding for the antigen, said part comprising a codon for an arginine residue, which is posttranslationally modified.

The term "a part of an mRNA molecule" is vague and does not clearly distinguish the claimed peptide from the 40 kD protein disclosed in D1 or from (pro)filaggrin. It could be just one or two nucleotides shorter than the full-length antigen.

From the wording of Claim 1 it is not clear that it is the modified arginine residues of the peptide which are recognized by the autoantibodies. It is stated in the claim that the mRNA coding for the antigen comprises a codon for an arginine residue, and that the arginine residue in the peptide which is reactive with autoimmune antibodies is a modified arginine residue. The same, of course, also applies to the protein of D1.

It should also be noted that even if the authors of D1 only much later found that the citrulline residues are constitutive of the epitopes recognized by RA autoantibodies, the fact that RA autoantibodies recognize citrulline residues of filaggrin is an inherent property of said autoantibodies.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL97/00624

The IPEA is therefore of the opinion that the subject-matter of Claims 1-3 and 7-8 is not novel with regard to D1.

Since the antibodies disclosed in D1 will crossreact with an antibody directed against a peptide as defined in Claim 1, also the subject-matter of Claims 10-12 and 15 is not considered novel.

4. Claims relating to the specific peptides shown in formulas II -XI (Claims 4-6) are considered as novel with regard to the prior art. Also novelty of the subject-matter of Claim 9, relating to a peptide which is a proteolytic fragment of (pro)filaggrin and which contains a modified arginine residue is acknowledged.
Since the short peptides according to Claims 4-6 and 9 also seem to increase the specificity of a rheumatoid arthritis test (few false positives) as compared to tests available from the prior art using other antigens (see e.g. D1, page 1389, first paragraph, or D2, which discloses the characterisation of antiperinuclear factor and its use in RA tests, Table 2), also an inventive step can be acknowledged for the subject-matter of said claims.
5. The antibody of Claim 13 is characterized as being crossreactive with a specific deposited antibody. Although it is not clear with which peptide the deposited antibody has been produced (plasmid RA3 is not described in the application), it is assumed that said antibody was prepared by immunization with one of the specific peptides of the invention. As is stated in the description, page 11, last paragraph, antibodies raised against filaggrin are not crossreactive with antibodies directed against the specific peptides of present application. Novelty and inventive step of Claim 13 can therefore be recognized.
6. None of the cited documents disclose or contemplate an organic compound which is able to compete with a peptide of any Claims 1-9 for binding to a specific antibody. The subject-matter of Claim 14 is therefore regarded as being novel and inventive.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL97/00624

SECTION VI -----

The French patent application **FR 2 752 842** was cited in the international search report. It corresponds to the international application **WO-A-98/08946**.

Since said document was published on 05.03.98, i.e. after the filing date of present application, it does not constitute prior art in the sense of Rule 64(1) PCT. Since said document claims, however, an earlier priority right as present application (30.08.96), it could become of relevance for the novelty of the claimed subject-matter during regional phase examination, provided that the national fees to the EPO will be paid.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Universiteit van Nijmegen
Biochemie
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen
Nederland

*name and address of the party to whom the
viability statement is issued*

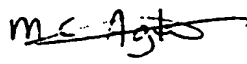
VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Universiteit van Nijmegen Biochemie Address: Postbus 9101 6500 HB Nijmegen Nederland	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 143.96 Date of the deposit or of the transfer: ¹ Wednesday, 13 November 1996
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on Monday, 25 November 1996 ² . On that date, the said microorganism was <input checked="checked" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ³ no longer viable	

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Centraalbureau voor Schimmelfcultures	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):
Address: Oosterstraat 1 P.O. Box 273 3740 AG BAARN The Netherlands	<div style="text-align: right;">drs F.M. van Asma dr M.C. Agterberg</div> <div style="text-align: center;"></div> Date: Monday, 25 November 1996

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

RECORD COPY

For receipt Office use only

PCT/NL 97 / 00624

International Application No.

14 NOV 1997

International Filing Date

14. 11. 97

BUREAU VOOR DE INDUSTRIËLE EIGENDOM
P.C.T. INTERNATIONAL APPLICATION

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) WO 800041-A1

Box No. I TITLE OF INVENTION Peptide derived from an antigen recognized by autoantibodies from patients with Rheumatoid Arthritis, antibody directed against said peptide, a combinatorial antigen.

Box No. II APPLICANT and a method of detecting auto-immune antibodies

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Stichting Scheikundig Onderzoek Nederland
Laan van Nieuw Oost-Indië 131
2593 BM DEN HAAG
The Netherlands

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

(31) 70 344 07 40

Facsimile No.

(31) 70 335 10 05

Teleprinter No.

State (i.e. country) of nationality:

NL

State (i.e. country) of residence:

NL

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☒ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Stichting voor de Technische Wetenschappen
Raadstede 15/19
3431 HA NIEUWEGEIN
The Netherlands

This person is:

☒ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

NL

State (i.e. country) of residence:

NL

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☒ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE: OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Altenburg, Bernardus Stephanus Franciscus et a
OCTROOIBUREAU LOS EN STIGTER B.V.
Weteringschans 96
1017 XS AMSTERDAM
The Netherlands

Telephone No.

(31) 20 623 68 32

Facsimile No.

(31) 20 626 00 07

Teleprinter No.

☐ Mark this check-box where no agent or common representative is has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Van Venrooij, Waltherus Jacobus Wilhelmus
Eleonoraweg 16
6523 MZ NIJMEGEN
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality: NL

State (i.e. country) of residence: NL

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Schellekens, Gerardus Antonius
Zwanenveld 37-03
6538 XV NIJMEGEN
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality: NL

State (i.e. country) of residence: NL

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Raats, Jozef Maria Hendrik
Van Diemerbroeckstraat 65
6512 BA NIJMEGEN
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality: NL

State (i.e. country) of residence: NL

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Hoet, René Michael Antonius
Weezenhof 35 - 40
6536 HB NIJMEGEN
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality: NL

State (i.e. country) of residence: NL

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ AP ARIPO Patent: GH Ghana, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakstan | Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | a national patent) which have become party to the PCT after |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg | <input type="checkbox"/> |

In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) of _____

The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM		Further priority claims are indicated in the Supplemental Box <input type="checkbox"/>	
The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:			
Country (in which, or for which, the application was filed)	Filing Date (day/month/year)	Application No.	Office of filing (only for regional or international application)
item (1) NL	(15.11.1996) november 15, 1996	1004539	
item (2)			
item (3)			

Mark the following check-box if the certified copy of the earlier application is to be issued by the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office (a fee may be required):

☒ The receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s): 1

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA /

Earlier search Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been carried out or requested and the Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of that earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request:

Country (or regional Office): NL Date (day/month/year): 19-08-1997 Number: NO 133752

Box No. VIII CHECK LIST

This international application contains the following number of sheets:

- | | | | |
|----------------|---|----|--------|
| 1. request | : | 4 | sheets |
| 2. description | : | 12 | sheets |
| 3. claims | : | 2 | sheets |
| 4. abstract | : | 1 | sheets |
| 5. drawings | : | 1 | sheets |

Total : 20 sheets

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|---|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> separate signed power of attorney (follows) | 5. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet |
| 2. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney | 6. <input checked="" type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganisms |
| 3. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature | 7. <input checked="" type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing (diskette) |
| 4. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): | 8. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): (English translation follows) |

Copy of Search Report

Figure No. of the drawings (if any) should accompany the abstract when it is published.

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Amsterdam, November 13, 1997

(In case of differences between the written and electronic sequences, the written version prevails)

B.S.F. Altenburg

Altenburg, Bernardus Stephanus Franciscus

For receiving Office use only		2. Drawings:	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	14 NOV 1997	(14. 11. 97)	<input type="checkbox"/> received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:			<input type="checkbox"/> not received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):			
5. International Searching Authority specified by the applicant: ISA /	o. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid		

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau: 05 DECEMBER 1997 05. 12. 97

Peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend antigeen, antilichaam daartegen, een combinatorieel antigeen, en een werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend antigeen, welk peptide reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immuunantilichamen.

Een dergelijk peptide is bekend uit de Europese octrooiaanvraag 0 511 116 (Clonatec S.A.). In deze aanvraag wordt een antigeen beschreven dat een fragment van filaggrine of profilaggrine omvat. Het peptide wordt herkend door auto-immuunantilichamen die specifiek zijn voor reumatoïde artritis. Reumatoïde artritis (RA) is een systemische auto-immuunziekte. Het is de meest voorkomende gewrichtsontstekingsziekte, is chronisch en kan leiden tot vergaande lichamelijke ongeschiktheid.

De onderhavige uitvinding beoogt een peptide te verschaffen dat reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immuunantilichamen, welk peptide geschikt is voor diagnostisch onderzoek met verhoogde specificiteit en tevens bruikbaar is voor verdere doelen zoals het verkrijgen (opwekken, selecteren en isoleren) van poly- en monoklonale antilichamen.

Hiertoe wordt het peptide volgens de uitvinding gekenmerkt doordat het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide correspondeert met een een codon voor een arginine-residu bevattend deel van een voor het antigeen coderend mRNA-molecuul, en het arginine-residu in het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide een gemodificeerd arginine-residu is.

Het peptide volgens de uitvinding dat een gemodificeerd arginine-residu bezit is op verrassenderwijze zeer geschikt gebleken voor de specifieke diagnose van reumatoïde artritis.

Er is voor RA tot op heden geen specifieke serologi-

sche test beschikbaar. De enige test die vaak wordt gebruikt berust op het bepalen van reumafactoren (RF; ref. 1) welke bij 70% van de RA-patiënten worden aangetroffen. Echter, deze test is weinig specifiek en kenmerkt zich door een relatief
5 hoog aantal vals-positieven. Van patiënten die aan systemische lupus erythematosus lijden is het percentage vals-positieven circa 20%, en bij gezonde individuen circa 5%.

Bij voorkeur wordt het peptide gekenmerkt doordat het gemodificeerde arginine-residu als zijketen een zijketen
10 bezit met formule I van het formuleblad, waarbij

$X = \text{NH}_2, \text{CH}_3, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$

$Y = \text{O}, \text{NH}, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$

$Z = \text{O}, \text{NH} \text{ of } \text{CH}_2; \text{ en}$

$n = 2, 3 \text{ of } 4, \text{ onder de voorwaarde dat wanneer } X =$
15 $\text{NH}_2 \text{ en } Z = \text{NH}, Y \text{ geen NH is; en in het bijzonder is het gemodificeerde arginine-residu een citrulline-residu. Voor citrulline is } X = \text{NH}_2, Y = \text{O}, Z = \text{NH} \text{ en } n = 3.$

Een peptide dat de voorkeur geniet is het peptide gekozen uit de groep van peptiden met de formule II - X van
20 het formuleblad.

Zo kan met het peptide met de formule II bij circa 36% van de patiënten die lijden aan reumatoïde artritis worden vastgesteld dat zij daaraan lijden en is bij andere auto-immuunziekten en gezonde individuen het aantal vals
25 positieven minder dan 2%.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is het peptide een cyclisch peptide, bijvoorbeeld door aanwezigheid van een cystine-residu.

Een dergelijk cyclisch peptide vertonen in sommige
30 gevallen een verhoogde immunologische affiniteit.

Bij voorkeur is het cyclische peptide het peptide met de formule XI van het formuleblad.

Bij voorkeur is het peptide een synthetisch peptide.

Door middel van organische synthese kan het reactie-
35 ve peptide volgens de uitvinding in grote hoeveelheden zuiver worden verkregen, hetgeen het op grote schaal immunologisch testen mogelijk maakt.

Volgens een alternatieve uitvoeringsvorm wordt het peptide volgens de uitvinding gekenmerkt doordat het peptide

is verkregen door het proteolytisch behandelen van
(pro)filaggrine, scheiding van door proteolyse gevormde
peptidefragmenten en gevolgd door selectie op de aanwezigheid
van een gemodificeerd arginine-residu in een bij de proteoly-
5 tische behandeling gevormd peptide.

Aldus kunnen peptiden worden geïdentificeerd waarmee
de gevoeligheid van een test op reumatoïde artritis kan
worden verhoogd. Onder gevoeligheid wordt in de onderhavige
aanvraag verstaan het vermogen van een test een aan
10 reumatoïde artritis lijdende patiënt als zodanig te identi-
ficeren.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is het antigeen
(pro)filaggrine, en is het peptide reactief met van een aan
reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immuun-
15 antilichamen reactief met (pro)filaggrine.

Het is gebleken dat het peptide zeer geschikt is
voor het met hoge specificiteit (weinig vals-positieven)
testen op reuma.

De onderhavige uitvinding heeft tevens betrekking op
20 een antilichaam kruisreactief met een antilichaam opgewekt
tegen een peptide volgens de uitvinding.

Een dergelijk antilichaam is bruikbaar voor het
aantonen van reumatoïde artritis met behulp van coupes van
biopten en immunologische testen van het sandwich-type.

25 Bij voorkeur is het antilichaam een monoklonaal
antilichaam.

Volgens een verdere voorkeursuitvoeringsvorm is het
antilichaam verkregen onder gebruikmaking van een peptide
volgens de uitvinding als antigeen.

30 Een geschikt antilichaam volgens de uitvinding wordt
gekenmerkt doordat het kruisreactief is met het antilichaam
zoals dat wordt geproduceerd door Escherichia coli TG1 met
plasmide RA3, gedeponeerd bij het Centraalbureau voor Schim-
melcultures, Baarn, Nederland, onder aanwinstnummer CBS143.96

35 De uitvinding heeft verder betrekking op een organi-
sche verbinding welke een deel omvat dat met een peptide
volgens één van de conclusies 1 tot 9 kan concurreren om
binding aan een voor het peptide specifiek antilichaam,
waarbij ten minste het deel van de organische verbinding kan

worden bereid met behulp van combinatoriële chemie.

Dergelijke organische verbindingen kunnen worden gevonden door te selecteren op competitie met een peptide volgens de uitvinding om herkenning door een antilichaam
5 volgens de uitvinding, zoals het door E. coli CBS143.96 geproduceerde antilichaam. De organische verbindingen, die veelal goedkoper kunnen worden bereid dan antigenen die louter op basis van al dan niet aan de zijketen ervan gemodificeerde aminozuren worden bereid, zijn bruikbaar voor immu-
10 nologische pakketten voor het diagnostiseren van RA. Ook zouden zij, na koppeling aan een vaste drager, kunnen worden toegepast voor het door adsorptie verlagen van de auto-antilichamenspiegel in bloed van patiënten die lijden aan RA.

Tenslotte heeft de uitvinding betrekking op een
15 werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen tegen reumatoïde artritis.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt doordat ten minste één immunologisch reactief molecuul gekozen uit de groep bestaande uit i) een peptide volgens de
20 uitvinding; ii) een recombinatorieel organisch molecuul volgens de uitvinding; en iii) een antilichaam volgens de uitvinding, in een immunologische test wordt toegepast.

Naast een verhoogde gevoeligheid worden verdere voordelen bereikt, in het bijzonder een betere reproduceer-
25 baarheid, kwantitatieve informatie en betere bruikbaarheid voor prognostische toepassingen.

Het is voor de deskundige duidelijk dat binnen het kader van de onderhavige uitvinding diverse variaties mogelijk zijn. Zo kunnen de op het formuleblad weergegeven pepti-
30 den ook deel uitmaken van andere oligopeptiden. Zij kunnen aan een of beide uiteinden zijn voorzien van een of meer andere aminozuren en ook kunnen twee of meer peptiden volgens de uitvinding deel uitmaken van één oligopeptide. Ook is het mogelijk om de peptiden met een of meer aminozuren in te
35 korten, zolang dit de reactiviteit niet wezenlijk nadelig beïnvloedt. De deskundige is bekend met de wijze waarop peptiden en organische verbindingen volgens de uitvinding desgewenst kunnen worden voorzien van een label of aan een drager kunnen worden gekoppeld, en hoe een immunologische

test op basis van dergelijke antigenen kan worden ontwikkeld onder gebruikmaking van in het vak welbekende standaard-technieken.

De uitvinding zal thans worden toegelicht aan de
5 hand van het volgende voorbeeld.

Materiaal en methoden.

Peptide synthese: Peptiden werden geselecteerd voor synthese op basis van aminozuurvolgorden afgeleid van bekende cDNA-volgorden van menselijk profilaggrine (ref. 2; ref. 3).
10 De peptiden werden op een vaste fase gesynthetiseerd onder gebruikmaking van de werkwijze beschreven door Schellekens et al. (ref. 4). De peptiden waren voor ten minste 95% zuiver, zoals bepaald aan de hand van het elutiepatroon met behulp van reversed phase chromatografie en de relatieve absorptie
15 bij 214 nm. De samenstelling van de peptiden werd bevestigd met behulp van massa-spectrometrie (MALDI-MS). Alle peptiden werden gesynthetiseerd als peptide-amiden.

TABEL 1

Gesynthetiseerde peptiden

De peptiden waarvan de naam begint met "cf" zijn op basis van het C-eindstandige uiteinde (aminozuren 306-324); en de peptiden waarvan de naam begint met "nf" zijn gebaseerd op de volgorde nabij het N-eindstandige uiteinde (aminozuren 18-32 voor nfc1). Aminozuurvolgorden op basis van cDNA van een profilaggrine-repeat.

naam	peptide volgorde*
cfc1	S H Q E S T X G R S R G R S G R S G S
cfc2	S H Q E S T R G X S R G R S G R S G S
cfc3	S H Q E S T R G R S X G R S G R S G S
cfc4	S H Q E S T R G R S R G X S G R S G S
cfc5	S H Q E S T R G R S R G R S G X S G S
cfc6	S H Q E S T X G X S R G R S G R S G S
cfc7	S H Q E S T X G R S X G R S G R S G S
cfc8	S H Q E S T X G R S R G X S G R S G S
cfc9	S H Q E S T X G R S R G R S G X S G S
cf	S H Q E S T R G R S R G R S G R S G S
cfA	S H Q E S T A G R S R G R S G R S G S
cfE	S H Q E S T E G R S R G R S G R S G S
cfQ	S H Q E S T Q G R S R G R S G R S G S
nfc1	T G P S T R G R Q G S X H E
nf	E S S H G W T G P S T R G R Q G S R H E

* (A = alanine; G = glycine; H = histidine; E = glutamine-zuur; P = proline; R = arginine; Q = glutamine; S = serine; T =threonine; W = tryptophaan; X = citrulline)

Detectie met behulp van ELISA.

30

De peptiden werden covalent gekoppeld via een N-oxysuccinimide-opppervlak aan de putjes van microtiter platen met 96 putjes (Costar amide-bindingsplaten) in een hoeveelheid van 1 µg/putje. Het koppelen geschiedde gedurende 16 uur bij 4EC en pH 9,0. De platen werden gedurende 1 uur geblokt met 2% runderserumalbumine. De sera werden 200-voudig verdund in een verdunningsoplossing (0,3% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 vol.%/vol.% Triton X-100, 0,5 % gew.%/vol.% Na-desoxycholaat, 0,1% SDS) aangevuld met 10% normaal konijnenserum, en gedurende 1 uur bij kamertempera-
 40 tuur geïncubeerd. Na wassen van de platen (3 keer met PBS met 0,05 vol.% Tween®20), werd 100 µl anti-humaan IgG geconjugeerd met peroxidase (Dako P214), 1000 keer verdund in verdunningsbuffer,

aan de putjes toegevoegd. Na gedurende 1 uur incuberen bij kamertemperatuur werden de platen 3 keer gewassen met PBS/Tween®20, en gebonden antilichamen werden gedetecteerd met tetramethylbenzidine als substraat. De reactie werd na 10 minuten gestopt door
5 het toevoegen van 100 μ l 2 M zwavelzuur per putje. Uitlezen geschiedde bij 450 nm. Sera met een OD₄₅₀ van 0,2, na aftrekken van de blanco voor het betreffende serum (een putje waarbij geen peptide was gekoppeld), werden als positief beschouwd.

Resultaten.

10 De resultaten zijn samengevat in tabel 2. In het totaal werd sera van 288 patiënten met reumatische aandoeningen gebruikt, waarvan 132 afkomstig van patiënten die leden aan reumatoïde artritis.

TABEL 2

Resultaten met peptide cfc1 tot en met cfc9 (formule II tot en met X van het formuleblad).

5	Peptide*	RA sera	controle	SLE ²	SSC ³	pSS ⁴	PM/DM ⁵
		(%) (n = 134)	sera ¹ (%) (n = 154)				
				(%) (n = 50)	(%) (n = 50)	(%) (n = 50)	(%) (n = 50)
	cfc1	49 (36)	1 (0.6)	1 (2)	0	0	0
	cfc2	27 (20)	4 (2.6)	1 (2)	0	1 (2)	1 (2)
	cfc3	37(28)	2 (0.6)	0	0	1 (2)	1 (2)
	cfc4	32 (24)	2 (1.3)	0	0	0	0
10	cfc5	64 (48)	1 (0.6)	0	1 (2)	2 (4)	1 (2)
	cfc6	65 (48)	1 (0.6)	0	0	2 (4)	1 (2)
	cfc7	60 (45)	1 (0.6)	0	0	1 (2)	1 (2)
	cfc8	55 (41)	1 (0.6)	0	0	1 (2)	1 (2)
	cfc9	57 (42)	1 (0.6)	0	0	2 (4)	0

15

¹) Controle sera zijn afkomstig van patiënten met reumatische aandoeningen anders dan RA.

²) SLE is systemische lupus erythematosus.

³) pSS is primaire syndroom van Sjögren.

20 ⁴) SSC is systemische sclerodermie.

⁵) PM/DM is polymyositis/dermatomyositis.

Van de in totaal 134 RA sera van patiënten die lijden aan reumatoïde artritis waren 102 positief met ten
 25 minste één peptide uit de reeks cfc1 tot en met cfc9. Derhalve was de gevoeligheid bij gebruikmaking van deze peptiden 76% (102/134). Van de in totaal 354 controle sera waren 13 sera positief op ten minste één peptide uit de reeks cfc1 tot en met cfc9. Derhalve was de testgevoeligheid, uitgedrukt als
 30 het percentage terecht positieven, 96%. Van de 37 sera reactief met cfc3 waren geen sera die niet werden herkend door peptide cfc1 of cfc23. Van de sera reactief met cfc7, cfc8 en

cfc9 waren geen sera die niet werden herkend door cfc1, cfc2, cfc4, cfc5 of cfc6. Hetgeen betekent dat cfc2, cfc7, cfc8 en cfc9 geen bijdrage leveren aan een verhoging van de testgevoeligheid en een testgevoeligheid van 76% kan worden bereikt door gebruikmaking van de combinatie van de peptiden cfc1, cfc2, cfc4, cfc5 en cfc6.

Bij deze percentages wordt opgemerkt dat deze afhankelijk zijn van de door aanvraagster aangelegde drempelwaarde voor de specificiteit. Dezelfde meetgegevens (uit de ELISA-experimenten) kunnen worden geïnterpreteerd als een gevoeligheid van ca. 80-85% door te kiezen voor een iets geringere specificiteit, welke overigens nog steeds veel beter is dan met de bekende reumafactortest (ref. 1) kan worden bereikt.

Sera van patiënten lijdend aan diverse infectieziekten (borrhelia, syfilis, malaria, endocarditis, legionella, tuberculose, mycoplasma, chlamydia, yersinia, salmonella, parvovirus B19, Epstein-Barr virus, rubella, schistosomiasis, toxoplasma, leishmaniasis, Chagas) werden getest op de aanwezigheid van antilichamen reactief met cfc1. Van de 308 geteste sera waren er 9 positief. De specificiteit was derhalve 97%, een aanmerkelijke verbetering ten opzichte van de RF-test.

Varianten van cfc1 waarbij citrulline werd vervangen door een neutraal (alanine; cfA), zuur (glutaminezuur; cfE) of amide (glutamine; cfQ) residu bleken niet immunologisch reactief te zijn. Hetzelfde geldt voor het controle peptide cf, dat geen gemodificeerd arginine-residu bezit.

Een cyclische variant (met de formule XI van het formuleblad, waarin twee cysteine residuën (C) middels een zwavelbrug zijn verbonden) van cfc1 werd met behulp van de hierboven beschreven ELISA getest op 134 RA sera. Deze cyclische variant bleek reactief te zijn met 85 sera (63%), hetgeen een verhoging van de gevoeligheid betekent. Van de 154 sera van aan andere reumatische aandoeningen dan RA lijdende patiënten bleken er 3 positief (specificiteit 98%). In het prioriteitsdocument van de onderhavige aanvraag wordt melding gemaakt van 5 foutief positieve bepalingen. Gebleken is echter dat in twee van die gevallen de patiënten wel degelijk aan RA leden. Geen enkel serum van 59 gezonde individuen was

positief met dit cyclische peptide, noch met een van de peptiden cfc1 tot en met cfc9. De cyclische peptide variant bleek reactief met 4 sera van de 200 additionele controle sera (50 SLE, 50 SCC, 50 pSS, 50 PM/DM) zodat de specificiteit ten opzichte van deze sera 98% bedraagt. Van sera van patiënten lijdend aan diverse infectieziekten (308 sera zoals bovenstaand omschreven) bleken 7 sera positief op de cyclische peptide variant zodat de specificiteit ten opzichte van deze sera ook hier 98% bedraagt. Het gebruik van de cyclische peptide variant verbetert dus de sensitiviteit in vergelijking met de individuele lineaire peptide varianten, maar verbetert ook de specificiteit door een verbeterde signaal-ruis verhouding in de beschreven ELISA test.

Een tweede citrulline gesubstitueerd peptide (nfc1) bleek specifiek reactief met 10% van de RA sera te zijn, maar niet met het controle peptide nf dat geen citrulline bezit. Van de met nfc1 reactieve RA sera waren enkele sera niet reactief met cfc1 tot en met cfc9. Derhalve kan de gevoeligheid van een test op reumatoïde artritis worden verhoogd door het toepassen van meer peptiden met een gemodificeerd arginine-residu.

Vanzelfsprekend kunnen er meer gemodificeerde arginine-residuen in een peptide aanwezig zijn maar kan het peptide anderzijds ook een of meer niet-gemodificeerde arginine-residuen bezitten.

Aanvraagster houdt het voor mogelijk dat bij andere auto-immuunziekten eveneens gemodificeerde aminozuren, in het bijzonder die afgeleid van arginine-residuen, een rol spelen. Derhalve is de uitvinding tevens gericht op peptiden met gemodificeerde aminozuren welke reactief zijn met auto-antilichamen afkomstig van patiënten lijdend aan andere auto-immuunziekten dan reumatoïde artritis. In het bijzonder betreft het peptiden waarbij met een gemodificeerd arginine-residu waarbij $X = \text{NHCH}_2$ (waarbij $Y = \text{NH}$ of NCH_3) of $\text{NH}(\text{CH}_3)_2$ is, welke peptiden bruikbaar zullen zijn voor de detectie van auto-immuunziekten waarbij nucleaire auto-antigenen een rol spelen, zoals SLE, sclerodermie, primair syndroom van Sjögren en polymyositis/dermatomyositis. Deze peptiden zijn bruikbaar voor de ontwikkeling van monoclonale antilichamen daartegen

alsmede voor bij de diagnose van de betreffende auto-immuun-
ziekten, in het bijzonder de detectie van de aanwezigheid van
auto-immuunantilichamen in lichaamsvloeistof, zoals bloed,
plasma en serum, van patiënten waarvan wordt gedacht dat deze
5 aan de auto-immuunziekte zouden kunnen leiden. Wederom bieden
de peptiden en antilichamen de mogelijkheid voor het ontwik-
kelen van een organische verbinding met behulp van combinato-
riële chemie, welke verbinding binnen het kader van de uit-
vinding wordt omvat.

10 Het door de aanvraagster beschreven recombinante
monoklonale antilichaam is reactief met peptide cfcl maar
niet met de controle peptiden cfA, cfE, cfQ of cf. Het com-
mercieel verkrijgbare monoklonale antilichaam AKH1 (ref.5),
gericht tegen humaan filaggrine, is niet reactief met enig
15 hier omschreven peptide en is derhalve niet kruisreactief met
een antilichaam opgewerkt tegen een peptide volgens de uit-
vinding. Het polyklonale serum anti-54 kD (ref.5), opgewekt
tegen filaggrine, is niet reactief met enig hier omschreven
peptide en is derhalve niet kruisreactief met een antilichaam
20 reactief met een peptide volgens de uitvinding. Dit sugge-
reert dat in een normale immuunreactie geen antilichamen
hoeven te worden gevormd welke kruisreactief zijn met een
antilichaam opgewekt tegen een peptide volgens de uitvinding.

REFERENTIES.

- 1) Smolen, J.S., (1996) Autoantibodies in rheumatoid arthritis, in Manual of biological markers of disease (W.J. van Venrooij en R.N. Maini, red.) deel C Hoofdstuk 1.1 blz. 1-18. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht.
- 2) McKinley-Grant, L.J., Idler, W.W., Bernstein, I.A., Parry, D.A.D., Cannizzaro, L., Croce, C.M., Huebner, K., Lessin, S.R. & Steinert, P.M. (1989) Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21.
Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 86, blz. 4848-4852.
- 3) Gan, S.Q., McBride, O.W., Idler, W.W., Nediaalka, M. & Steinert, P.M. (1990) Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene.
Biochemistry 29, blz. 9432-9440.
- 4) Schellekens, G.A., Lasonder, E., Feijlbrief, M., Koedijk, D.G.A.M., Drijfhout, J.W., Scheffer, A.J., Welling-Wester, S & Welling, G.W. (1994) Identification of the core residues of the epitope of a monoclonal antibody raised against glycoprotein D of herpes simplexvirus 1 by screening of a random peptide library.
The European Journal of Immunology 24, blz. 3188-3193.
- 5) Hoet, R.M.A., Boerbooms, A.A.Th., Arends, M., Ruiter, D.J., van Venrooij, W.J. (1991) Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin.
Annals of the Rheumatic diseases 50, blz. 611-618.

CONCLUSIES

1. Peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend antigeen, welk peptide reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immuunantilichamen, **met het**
5 **kenmerk**, dat het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide correspondeert met een een codon voor een arginine-residu bevattend deel van een voor het antigeen coderend mRNA-molecuul, en het arginine-residu in het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide een
10 gemodificeerd arginine-residu is.

2. Peptide volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat het gemodificeerde arginine-residu als zijketen een zijketen bezit met formule I van het formuleblad, waarbij

X = NH_2 , CH_3 , NHCH_3 of $\text{N}(\text{CH}_3)_2$;
15 Y = O, NH, NHCH_3 of $\text{N}(\text{CH}_3)_2$;
Z = O, NH of CH_2 ; en
n = 2, 3 of 4

onder de voorwaarde dat wanneer X = NH_2 en Z = NH, Y geen NH is.

20 3. Peptide volgens conclusie 1 of 2, **met het kenmerk**, dat het gemodificeerde arginine-residue een citrulline-residu is.

4. Peptide volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het peptide is gekozen uit de groep van
25 peptiden met de formule II - X.

5. Peptide volgens één van de conclusies 1 tot 3, **met het kenmerk**, dat het peptide een cyclisch peptide is.

6. Peptide volgens conclusie 5, **met het kenmerk**, dat het cyclische peptide de formule XI heeft.

30 7. Peptide volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het peptide een synthetisch peptide is.

8. Peptide volgens één der voorgaande conclusies, **met het kenmerk**, dat het antigeen (pro)filaggrine is, en het peptide reactief is met van een aan reumatoïde artritis
35 lijdende patiënt afkomstig auto-immuunantilichamen reactief met (pro)filaggrine.

9. Peptide volgens één van de conclusies 1 tot 6, met het kenmerk, dat het peptide is verkregen door het proteolytisch behandelen van het antigeen, scheiding van door proteolyse gevormde peptidefragmenten en gevolgd door selectie op de aanwezigheid van een gemodificeerd arginine-residu in een bij de proteolytische behandeling gevormd peptide.

10. Antilichaam kruisreactief met een antilichaam opgewekt tegen een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9.

11. Antilichaam volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat het antilichaam een monoklonaal antilichaam is.

12. Antilichaam volgens conclusie 10 of 11, met het kenmerk, dat het antilichaam is verkregen onder gebruikmaking van een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9 als antigeen.

13. Antilichaam volgens één van de conclusie 9 tot 12, met het kenmerk, dat het kruisreactief is met het antilichaam zoals dat wordt geproduceerd door Escherichia coli TG1 met plasmide RA3, gedeponeerd bij het Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nederland, onder aanwinstnummer CBS143.96.

14. Organische verbinding welke een deel omvat dat met een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9 kan concurreren om binding aan een voor het peptide specifiek antilichaam, waarbij ten minste het deel van de organische verbinding kan worden bereid met behulp van combinatoriële chemie.

15. Werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen, met het kenmerk, dat ten minste één immunologisch reactief molecuul gekozen uit de groep bestaande uit i) een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9; ii) een organische verbinding volgens conclusie 14; en iii) een antilichaam volgens één van de conclusies 10 tot 13, in een immunologische test wordt toegepast.

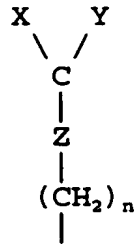
UITTREKSEL

De uitvinding heeft betrekking op een peptide afgeleid van een door auto-antilichamen herkend antigeen, welk peptide reactief is met de auto-immuunantilichamen van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt. Het peptide volgens
5 de uitvinding bezit een gemodificeerd arginine-residu. De uitvinding heeft tevens betrekking op antilichamen tegen het peptide en een werkwijze voor het detecteren van auto-immuun-antilichamen. Licentieverlening mogelijk.

1/1
FORMULEBLAD

5

I



10

15

II S H Q E S T X G R S R G R S G R S G SIII S H Q E S T R G X S R G R S G R S G SIV S H Q E S T R G R S X G R S G R S G S

20

V S H Q E S T R G R S R G X S G R S G SVI S H Q E S T R G R S R G R S G X S G S

25

VII S H Q E S T X G X S R G R S G R S G SVIII S H Q E S T X G R S X G R S G R S G SIX S H Q E S T X G R S R G X S G R S G S

30

X S H Q E S T X G R S R G R S G X S G SXI H Q C H Q E S T X G R S R G R C G R S G S

35